

FERNANDO DE SOUZA FONSECA GUIMARÃES

**INTERAÇÃO ENTRE MACRÓFAGOS, LINFÓCITOS E CÉLULAS DE
MELANOMA EM CO-CULTURA APÓS TRATAMENTO COM MEDICAMENTO
CANOVA**

Monografia de conclusão de curso apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas, apresentada ao Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Orientação: Prof^a. Dr^a Dorly de Freitas Buchi. Co-Orientação: MSc Simone M. de Oliveira.

CURITIBA, 2007

Ao meu pai, Archimedes F.
Guimarães Jr., por todas as
circunstâncias favoráveis para a
concretização de meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Dorly de F. Buchi e a toda a equipe do Laboratório de Pesquisa em Células Inflamatórias e Neoplásicas pelas colaborações, orientações e paciência comigo. Em especial à Simone M. de Oliveira, minha co-orientadora, por todos os ensinamentos sobre técnicas de microscopia, discussões científicas e burocráticas, ao Raffaello P. Di Bernardi e Carolina C. de Oliveira por facilitarem meu aprendizado sobre a citometria de fluxo.

Aos professores Anita Nishyama, Célia Regina C. Franco, Edvaldo da Silva Trindade, Juarez Gabardo, Lucélia Donatti, Luiz Cláudio Fernandes, Marco A. F. Randi, Maria das Graças Bicalho, Ruth J. G. Schadeck e Silvio M. Zanata por todo o apoio, conselhos pessoais e profissionais, além de trocas de protocolos.

A equipe do Biotério da UFPR: Júlio, Izelen, Luis, Cândido e demais funcionários pelo apoio e disponibilidade.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica: Matilde, Regina, Rosângela e Sérgio pelo auxílio no processamento e análise de amostras para os microscópios eletrônicos de varredura e transmissão.

As secretárias Gerizalda do Depto de Biologia Celular e Rosane da coordenação do curso de Ciências Biológicas da UFPR pelo auxílio em questões administrativas.

À minha namorada Rafaela pelo carinho e paciência em todos os momentos.

Aos amigos Cíntia C. Palu, Edis, Fábio Gaio Chimentão, Karine Vairo, Rodrigo Schuh, Felipe M. Maurutto, Vanessas, Julianas (os), Tiagos, dentre tantos outros dos cursos de Biologia, Medicina, Biotecnologia, pós-graduações e demais parceiros de tempo livre, conversas e DGGs.

Aos camundongos, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado.

A Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Paraná (SETI-PR), ao PIBIC/CNPq e à Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
1. LISTA DE FIGURAS.....	6
2. INTRODUÇÃO.....	7
2.1. O melanoma.....	7
2.2. Imunoterapia.....	8
2.3. O medicamento Canova.....	9
3. JUSTIFICATIVA.....	10
4. OBJETIVOS.....	11
4.1. Objetivo geral.....	11
4.2. Objetivos específicos.....	11
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
5.1. Medicamento Canova.....	12
5.2. Animais.....	12
5.3. Cultivo celular.....	12
5.4. Ensaios de co-cultura.....	13
5.5. Microscopia óptica.....	14
5.6. Microscopia eletrônica de varredura.....	14
5.7. Microscopia de epifluorescência.....	15
5.8. Citometria de fluxo.....	15
6. RESULTADOS.....	17
6.1. Microscopia óptica.....	17
6.2. Microscopia eletrônica de varredura.....	20
6.3. Microscopia de epifluorescência – Ensaio de apoptose TUNEL.....	22
6.4. Citometria de fluxo.....	23
7. DISCUSSÃO.....	26
8. CONCLUSÃO.....	28
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
10. ANEXOS.....	33

1. LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Nódulos de melanoma cutâneo e metástase de melanoma em linfonodo.....	7
FIGURA 2 Resultados – Microscopia óptica.....	17-19
FIGURA 3 Resultados – Microscopia eletrônica de varredura.....	20-21
FIGURA 4 Resultados – Citometria de fluxo.....	22-25

RESUMO

O melanoma é o tipo mais agressivo de câncer de pele e possui incidência crescente na população mundial. O tratamento de melanoma com quimioterápicos tem desapontado pela grande resistência do mesmo às drogas convencionais. Canova (CA) é um medicamento homeopático com propriedades imunomoduladoras, recomendado para pacientes nos quais o sistema imunitário está deprimido. Estudos prévios demonstraram que CA não é tóxico, nem mutagênico e atua ativando macrófagos (Mo) *in vitro* e *in vivo*. Observações *in vitro* mostraram significativa diminuição na produção da citocina TNF- α , aumento na produção de óxido nítrico (NO) e no índice endocítico. CA regula positivamente o número de leucócitos e melhora a resposta de camundongos contra o Sarcoma-180. No atual estudo analisamos o efeito *in vitro* da estimulação de linfócitos de linfonodo quando submetidos a co-cultura com macrófagos tratados e depois colocados para interagir com células de melanoma murino B16F10. Os resultados mostraram que os linfócitos em contato com macrófagos previamente tratados com CA obtiveram maior capacidade de destruir as células de melanoma. Os macrófagos tratados ativam e aumentam a viabilidade dos linfócitos, aumentando a eficácia dos mesmos na destruição das células B16F10. Essa ativação linfocitária acontece pelo contato direto ou quando cultivados em placas transwell. Nossos resultados mostram o medicamento CA como um poderoso imunomodulador para a resposta imunitária anti-tumoral.

2. INTRODUÇÃO

2.1. O melanoma

O melanoma representa um significativo e crescente problema na saúde pública mundial. Quando detectado em estágios iniciais, os nódulos de melanoma podem ser removidos cirurgicamente. Pacientes com melanoma avançado possuem tempo médio de vida menor que um ano e a estimativa para cinco anos de sobrevivência é menor que 15% (RIGEL; CARUCCI, 2000). O melanoma é um câncer de pele agressivo e possui grande potencial metastático, particularmente em linfonodos, pulmão e cérebro. Os tratamentos com quimioterápicos têm desapontado e no momento há poucos agentes quimioterápicos para o tratamento de melanoma metastático que ofereçam taxas de resposta maiores que 25%, além disto apresentam efeitos colaterais severos. No panorama mundial, aproximadamente 90 % das mortes decorrentes de câncer, são devido à casos de melanoma maligno (RIGEL; CARUCCI, 2000; THOMPSON; SCOLYER; KEFFORD, 2005).

FIGURA 1 NÓDULOS DE MELANOMA CUTÂNEO E METASTASE EM LINFONODO



Nódulos negros e globulares de melanoma cutâneo fig. A e B e tumor metastático em linfonodo sentinela fig. C (THOMPSON; SCOLYER; KEFFORD, 2005).

2.2. Imunoterapia e a homeopatia

A imunoterapia prossegue sendo investigada intensivamente como possibilidade de terapia adjuvante. Dentro da imunoterapia há pesquisas envolvendo a ativação do sistema imunitário do paciente com neoplasia para melhorar a resposta do próprio organismo, como o uso de vacinas confeccionada a partir de fragmentos tumorais inativado e com adjuvantes e estimulação com citocinas ativadoras de células imunitárias como interferons e interleucinas (MOLIFE; HANCOCK, 2002). Pesquisas laboratoriais com medicamentos homeopáticos são escassas, na maioria das vezes restringidas a estudos clínicos, com metodologias variadas, controversas e com resultados duvidosos. No Brasil a homeopatia deixou de ser considerada terapia alternativa quando foi reconhecida como especialidade médica pela portaria nº 1000 de 1980 pelo Conselho Federal de Medicina. (NOGUEIRA et al., 1986). Na Europa, por exemplo, a homeopatia é a mais comum terapia médica complementar (MILLAZO et al., 2006).

2.3. O medicamento Canova

Desde 1997 nosso grupo vem encontrando importantes resultados com estudo focado no medicamento homeopático Canova. Sua manipulação é baseada nas técnicas homeopáticas de Hahnemann, a qual usa substâncias altamente diluídas e dinamizadas durante a preparação. Observações clínicas confirmam o sucesso deste tratamento que aparenta permitir que o próprio sistema imunológico do paciente responda positivamente a diversas condições patológicas. Muitos pacientes e médicos relatam resultados similares, tais quais aumento de apetite, redução de dores e retorno às atividades diárias. O medicamento Canova é um produto comercial que representa uma nova forma de terapia imunomodulatória. É aquoso, inodoro, incolor e é comercializado em farmácias brasileiras autorizadas. Canova é um medicamento homeopático composto produzido no Brasil a partir de *Aconitum napellus* (acônito), *Thuya occidentalis* (tuia), *Bryonia alba* (nabo-do-diabo), *Lachesis muta* (surucucu) e *Arsenicum álbum* (trióxido de arsênico). Estudos prévios demonstraram que Canova ativa macrófagos tanto *in vivo* como *in vitro*. Foi observado que a

produção *in vitro* do fator de necrose tumoral (TNF- α) por macrófagos é significativamente diminuída quando há o tratamento com CANOVA (PIEMONTE; BUCHI, 2002). A atividade enzimática da NADPH oxidase está aumentada assim como a da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), resultando na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) respectivamente (OLIVEIRA et al., 2006). CANOVA estimula o aumento da atividade do sistema endosomal/lisosomal assim como a atividade fagocítica dos macrófagos em interação com *Saccharomyces cerevisiae* e *Trypanosoma cruzi* epimastigotas (LOPES et al., 2006). Os efeitos modulatórios do CANOVA também foram observados tanto *in vivo* como *in vitro* na infecção experimental por *Leishmania amazonensis* e *Paracoccidioides braziliensis*, controlando a progressão e disseminação da infecção (PEREIRA et al., 2005, TAKAHACHI et al., 2006). Além disso o medicamento não é tóxico e nem mutagênico (SELIGMANN et al., 2003). A resposta imunitária proveniente do tratamento com CANOVA também foi demonstrada em estudos com o Sarcoma 180 onde foi encontrada até remissão de 30% dos tumores. Nas massas tumorais que permaneceram houve uma significativa redução do volume tumoral, assim como significativa infiltração leucocitária, granulação tecidual e fibrose circundante ao tumor. No grupo tratado todos os animais sobreviveram. O tratamento com CANOVA aumentou o número total de leucócitos especialmente os linfócitos T, onde houve aumento dos CD4, B e NK (SATO et al., 2005), sugerindo que o CANOVA age direta ou indiretamente na hematopoiese. Conseqüentemente estudos com células de medula óssea foram realizados utilizando técnicas microscópicas e citometria de fluxo, revelando que a linhagem monocítica (CD11b) e as células estromais foram ativadas pelo tratamento (ABUD et al., 2006; CESAR et al., *in press*).

3. JUSTIFICATIVA

O melanoma é um tumor agressivo com grande potencial metastático, particularmente em linfonodos, pulmão e cérebro. Tratamentos convencionais existentes têm desapontado, não oferecendo taxas de recuperação maiores que 25%. Observações clínicas de pacientes portadores de neoplasias tratados também com o medicamento Canova confirmam sua efetividade, permitindo que o próprio sistema imunitário do paciente auxilie na resposta positiva. Resultados prévios em animais com Sarcoma-180 sob tratamento com CA mostraram significativa redução do volume tumoral, remissão de 30% dos tumores e resposta imunológica ativada nos animais tratados. Dessa forma, o estudo da utilização do medicamento CA com células de melanoma, pode contribuir para um maior conhecimento sobre os mecanismos de ação desse medicamento na atividade imunitária anti-tumoral, além de propor uma possibilidade terapêutica no tratamento dessa doença.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar a ação do medicamento Canova sobre a resposta anti-tumoral de células imunitárias *in vitro*.

4.2. Objetivos Específicos

- Realizar a imunofenotipagem dos linfócitos de linfonodo.
- Adequar protocolos de cultivo celular de linfócitos e co-cultura de macrófagos, linfócitos e células de melanoma B16F10.
- Avaliar através de microscopia óptica as co-culturas celulares entre linfócitos, macrófagos e células B16F10 e as respectivas intensidade de interação celular.
- Verificar a expressão do marcador de ativação linfocitária CD25, ativação de linfócitos tratados por com Canova por citometria de fluxo.
- Avaliar a influência do tratamento com Canova na resposta e interação celular de linfócitos e macrófagos sobre células de melanoma murino por microscopia eletrônica de varredura e de fluorescência.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Medicamento Canova

Canova (CA) é um medicamento comercial que representa nova forma de imunoterapia e segue as técnicas homeopáticas de Hahnemann. Tinturas-mãe são adquiridas a partir de agências autorizadas e indicadas pelo Ministério de Saúde que asseguram a qualidade (livre de endotoxinas) e composição físico-químico dos produtos. A partir da tintura-mãe original, são realizadas diversas diluições em água destilada. O produto final é composto de *Aconitum napellus* (Ranunculaceae), *Thuja occidentalis* (Cupresaceae), *Bryonia alba* (Cucurbitaceae), *Arsenicum album* (trióxido de arsênico), veneno de *Lachesis muta* (Viperidae) e menos de 1% de álcool em água destilada (www.canovado brasil.com.br). Em nossos experimentos, usamos o produto comercial. O medicamento foi esterilizado por filtração em membranas estéreis 0,22µm (Millipore), mantido em local escuro à temperatura ambiente e vigorosamente sucussionado antes de cada tratamento experimental.

5.2. Animais

Os linfócitos e macrófagos utilizados nos ensaios experimentais foram retirados de camundongos suíços albinos de 2-3 meses de idade do Biotério da UFPR. Antes da extração das células os animais foram anestesiados com éter etílico e eutanaziados por deslocamento cervical. Todas as recomendações da Lei Nacional (No. 6.638, 5 de Novembro de 1979) para procedimentos científicos com animais foram seguidas e as práticas foram previamente aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animais da UFPR (Cópia do certificado anexada).

5.3. Cultivo celular

Macrófagos: As células foram retiradas da cavidade peritoneal por lavagem com PBS pH 7,4 a 4°C e o número de células foi determinado por contagem em câmara de Neubauer. As células foram plaqueadas em garrafas ou placas de 24 poços e incubadas a 37° em estufa de CO₂. Após 15 minutos de incubação, as células não aderentes foram removidas por lavagem com PBS pH 7,4 a 37°C e as

aderentes foram cultivadas em meio de cultura “Dulbecco’s Modified Eagle Medium” (DMEM), suplementado com 10% de soro bovino fetal, contendo penicilina 1 U/ml, estreptomicina 1 µg/ml, e anfotericina 2,5 µg/l, em atmosfera úmida a 37° contendo 5% CO₂.

Linfócitos: Linfonodos mesentéricos foram removidos dos animais. O tecido foi dissociado em PBS utilizando dissociadores teciduais (Medicons, BD) e a suspensão resultante foi filtrada em Filcons 100 µm (BD) para a remoção de fragmentos teciduais. A suspensão celular foi incubada a 37° com 5% CO₂ por 40 min. As células não aderentes foram transferidas para tubos estéreis, lavadas por centrifugação com PBS três vezes a 1000 rpm por 8 minutos e contadas com contador automatizado de células (CELM). As células foram plaqueadas em garrafas ou placas de cultivo com o mesmo meio citado acima.

Células de melanoma murino: Células da linhagem B16F10, permanentemente mantidas no Departamento de Biologia Celular da UFPR, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Sílvio Marques Zanata do Departamento de Patologia Básica, foram utilizadas nos ensaios. As células cresceram no mesmo meio citado acima.

5.4. Ensaios de cultivo e co-cultura

Diversos grupos foram determinados para elucidar a ação do Canova nas células descritas acima. Os grupos foram:

- **B16F10** - Apenas células de melanoma, cultivadas por 48 horas;
- **B16F10/Ly** – Células de melanoma co-cultivadas com linfócitos por 48 horas;
- **B16F10/Mφ** - Células de melanoma co-cultivadas com macrófagos por 48 horas;
- **B16F10/Ly-Mφ** - Células de melanoma co-cultivadas por 48 horas com linfócitos que foram previamente co-cultivados com macrófagos por 24 horas. Os linfócitos foram removidos por lavagem com o próprio meio de cultura que compartilhavam com os macrófagos e foram transferidos para um cultivo pré-estabelecido de B16F10 já cultivadas por 24 horas;
- **Mφ/Ly** - Macrófagos co-cultivados com linfócitos por 48 horas.

- **M ϕ /Ly*** - Macrófagos co-cultivados com linfócitos sem contato celular (0,4 μ m insert) por 48 horas.

Os grupos de cultura e co-cultivos processados para microscopia óptica, eletrônica de varredura e de fluorescência foram plaqueados em placas 24/well, nos ensaios de co-cultura em sistemas sem contato as células foram plaqueadas em placas transwell (0.4- μ m pore size; Costar, Cambridge, MA) e os grupos processados para citometria de fluxo foram plaqueados em garrafas de cultura 50 cm². As concentrações das células seguiram o padrão de: linfócitos - 5×10^6 células/ml), macrófagos - 10^6 células/ml e células B16F10 – 5×10^5 células/ml. Todos os grupos foram feitos em 3 experimentos em triplicatas divididos em não tratados (grupo controle) e tratados com Canova, nos quais assim que foram plaqueados, 20% do medicamento Canova devidamente sucussionado foi adicionado ao meio de cultura e posterior tratamento a cada 24 horas de cultivo prosseguiu-se nos grupos em questão.

5.5. Microscopia óptica

As células B16F10 e as co-culturas B16F10/Ly, B16F10/M ϕ , B16F10/Ly-M ϕ e M ϕ /Ly descritas acima foram plaqueadas em placas de cultura contendo lamínulas de vidro para as análises morfológicas (BUCHI; DE SOUZA, 1993). Foram mantidas como descrito acima e após o tempo de cultivo foram lavadas com PBS a 37°C, fixadas em Bouin, coradas com Giemsa, desidratadas com etanol e as lâminas foram montadas com Entellan. As células aderentes foram observadas em microscópio Nikon Eclipse E200 (Protocolo detalhado em anexo).

5.6. Microscopia eletrônica de varredura

As células B16F10 foram cultivadas em placas de cultura contendo lamínulas de vidro por 24 horas e co-cultivadas por mais 48 horas com linfócitos previamente em contato com macrófagos, tratados com CA ou não (grupo controle). Macrófagos cultivados com linfócitos por 48 horas também foram processados. Após o tempo de cultivo, as células foram fixadas com glutaraldeído 2,5% (0,1 M tampão cacodilato, pH 7,2), lavadas e pós-fixadas com OsO₄ 1% por

30 minutos em temperatura ambiente e no escuro (BUCHI; DE SOUZA, 1993). Após lavagem com tampão Cacodilato 0,1M, as células foram desidratadas utilizando concentrações crescentes de etanol, desidratadas por ponto crítico de CO₂, metalizadas com ouro e analisadas no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM – 6360 LV SEM no Centro de Microscopia da UFPR (Protocolo detalhado em anexo).

5.7. Microscopia de epifluorescência

O processo de apoptose possui, dentre outras etapas, a ativação da Dnase ativada por caspase que resulta na degradação do DNA celular. Para determinar a apoptose nas células B16F10 e nos linfócitos, o DNA clivado das células aderentes foi mensurado por marcação com a técnica TUNEL (Terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP Nick End Labeling - APO-DIRECT Kit, BD Pharmingen). Após o tratamento, as células aderentes foram fixadas com paraformaldeído 1% em PBS (pH 7,4), reservadas em etanol 70% a –20°C por 24 h até a marcação. Para marcar os fragmentos de DNA, as células fixadas foram incubadas com 50 µl da mistura de reação TUNEL contendo TdT e FITC-dUTP e iodeto de propídio no tampão de ligação e incubadas por 60 minutos a 37°C. Então foram lavadas, as lâminas foram confeccionadas em meio Fluormount (EMS) e analisadas em microscópio de epifluorescência DMLS2 (LEICA). Contou-se aproximadamente 100 células por lamínula, 9 lamínulas por tratamento e os dados foram submetidos à análise de variância fator único (ANOVA) para determinar significância à $P < 0.05$ e $P < 0.01$.

5.8. Citometria de fluxo

Para a análise de imunofenotipagem foi retirada uma alíquota da suspensão celular dos linfonodos mesentéricos. As células foram marcadas com anti-CD3 conjugado com FITC e anti-CD4, anti-CD8, anti-CD18 e PanNK conjugados com PE. Os linfócitos co-cultivados foram ainda marcados com anti-CD25 conjugado com FITC com o mesmo protocolo e com 7-AAD para averiguação de viabilidade, sendo todos os reagentes da BD Pharmingen. A

análise de fluorescência foi realizada utilizando citômetro de fluxo FACSCalibur (Protocolo detalhado em anexo). Os dados foram adquiridos e analisados, respectivamente com os softwares Cell Quest (BD) e WinMDI 2.9. e submetidos à análise de variância (ANOVA) fator único para determinar significância à $P < 0.05$ e $P < 0.01$. Os resultados são representativos de três experimentos em triplicata.

Marcadores de superfície e viabilidade

Todos os reagentes a seguir foram adquiridos de BD Pharmingen

Marcador	Células
CD3	Linfócitos T
CD4	Linfócitos Th
CD8	Linfócitos Tc
CD19	Linfócitos B
PanNK (DX5)	Linfócitos NK
CD25	Linfócitos ativados
7-AAD	Células inviáveis

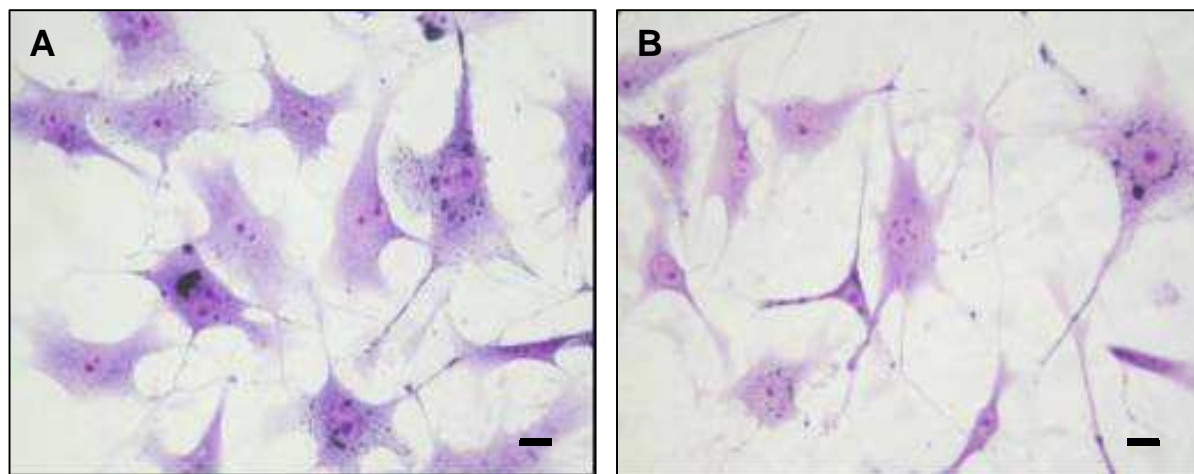
6. RESULTADOS

6.1. Microscopia óptica

A diferença entre os grupos foi observada qualitativamente sob observação da concentração celular por campo, interação celular e comparação entre os aspectos morfológicos entre os grupos tratado com CA e o grupo controle sem tratamento de modo a selecionar para posterior análise por MEV e por ensaio de apoptose o grupo de maior diferença.

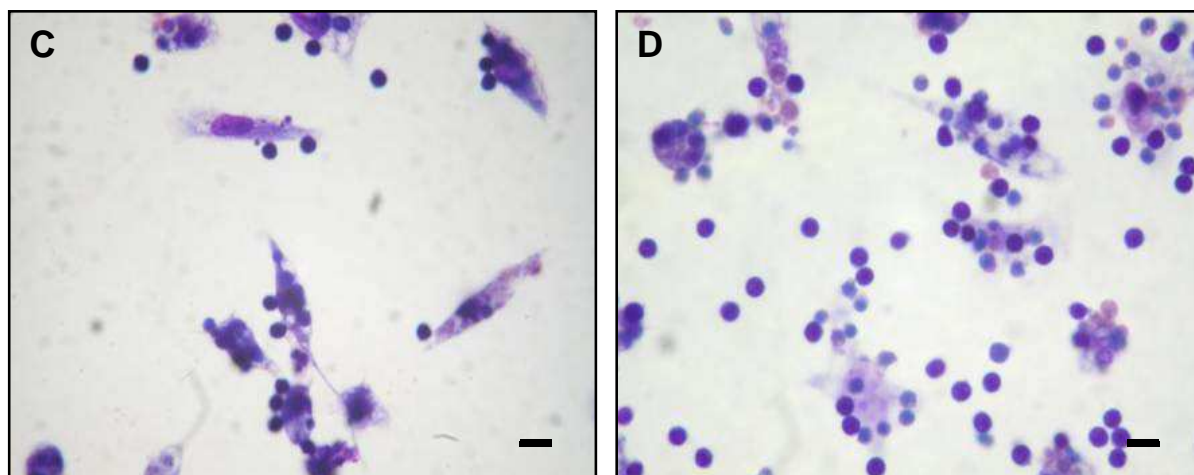
6.1.1. Grupo B16F10

As células B16F10 possuem características de rápida proliferação e ocupação dos campos em que estão cultivadas, além de morfologia espraçada com diversos prolongamentos citoplasmáticos e grânulos de melanina intracelulares. Não foram observadas diferenças morfológicas nas células B16F10 após o tratamento. Fig. A sem tratamento (controle) e Fig. B tratadas com CA. Barras: 30µm.



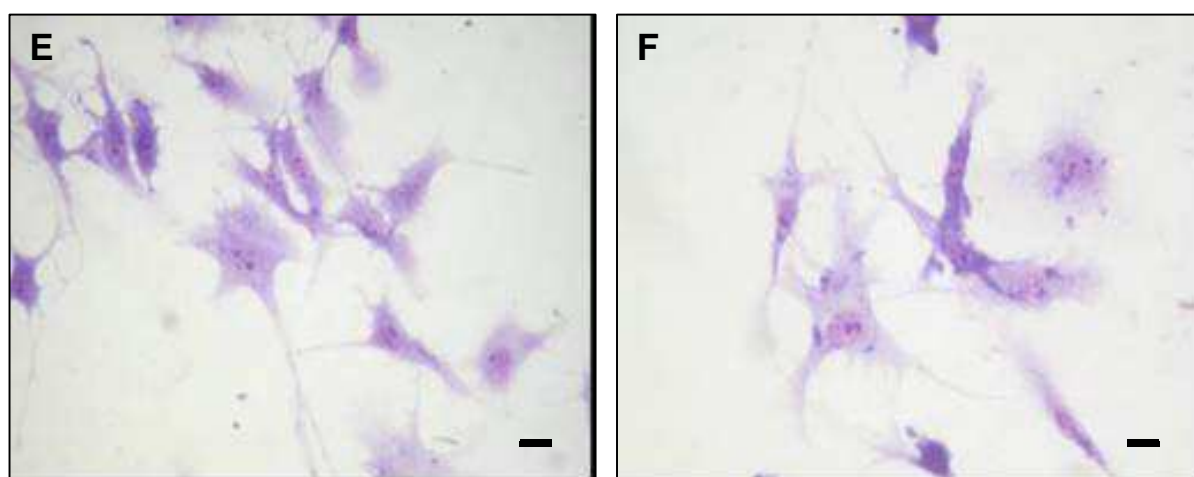
6.1.2. Grupo linfócitos em contato com macrófagos

Foi observado maior interação celular após o tratamento com Canova, pela maior concentração de linfócitos aderidos e em contato com os macrófagos. Fig. C sem tratamento (controle) e Fig. D tratadas com CA. Barras: 30 μ m.



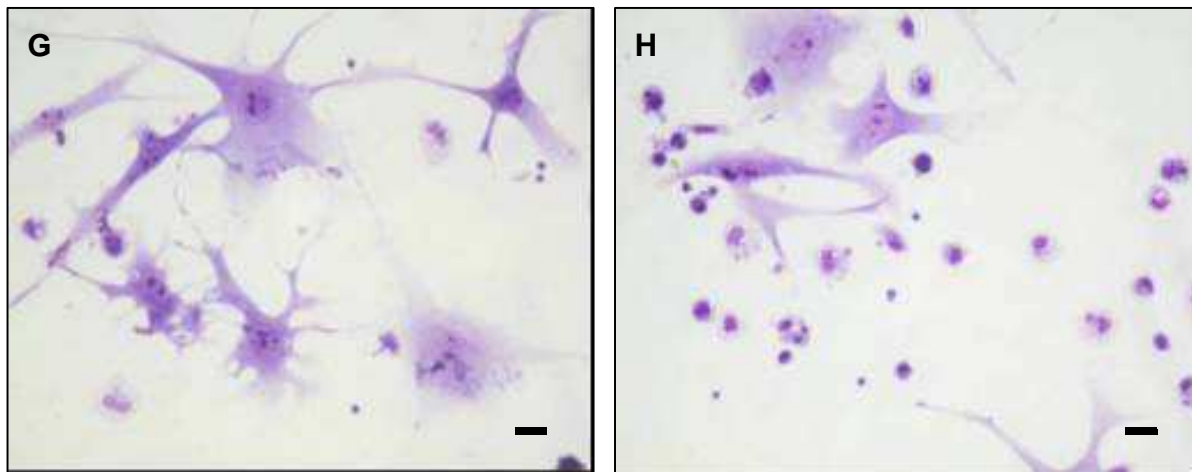
6.1.3. Grupo B16F10 em contato com linfócitos

Linfócitos diretamente co-cultivados com células B16F10 por 48 horas obtiveram discreto aumento na resposta anti-melanoma no grupo Canova observado pela diminuição da densidade celular das células de B16F10 aderidas. Fig. E sem tratamento (controle) e Fig. F tratadas. Barras: 30 μ m.



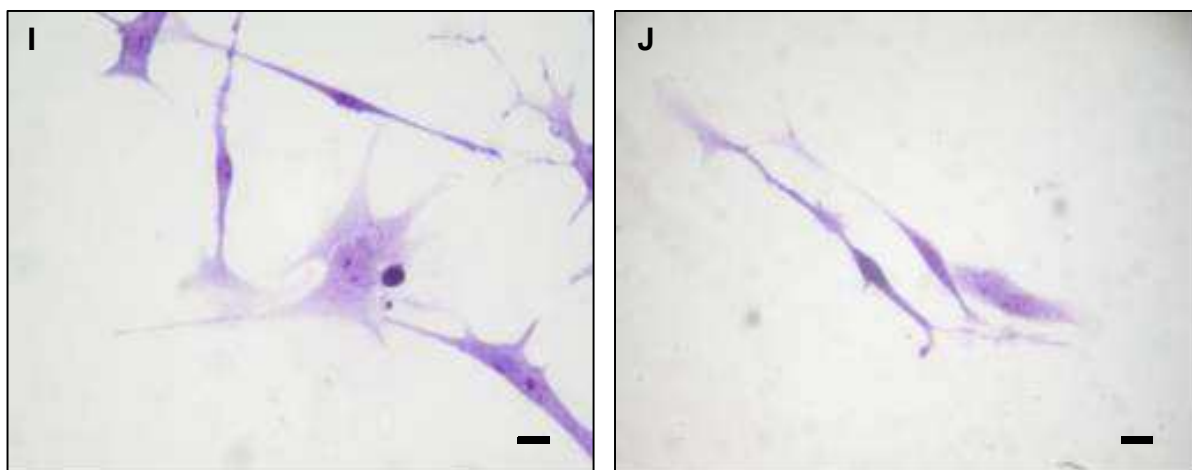
6.1.4. Grupo B16F10 em contato com macrófagos

Macrófagos peritoneais diretamente co-cultivados com células B16F10 por 48 h obtiveram discreto aumento na resposta anti-melanoma no grupo Canova observado pela diminuição da densidade das células de melanoma e maior quantidade de macrófagos aderidos. Fig. G sem tratamento (controle) e Fig. H tratadas. Barras: 30 μ m.



6.1.5. Grupo B16F10 em contato com linfócitos previamente co-cultivados com macrófagos

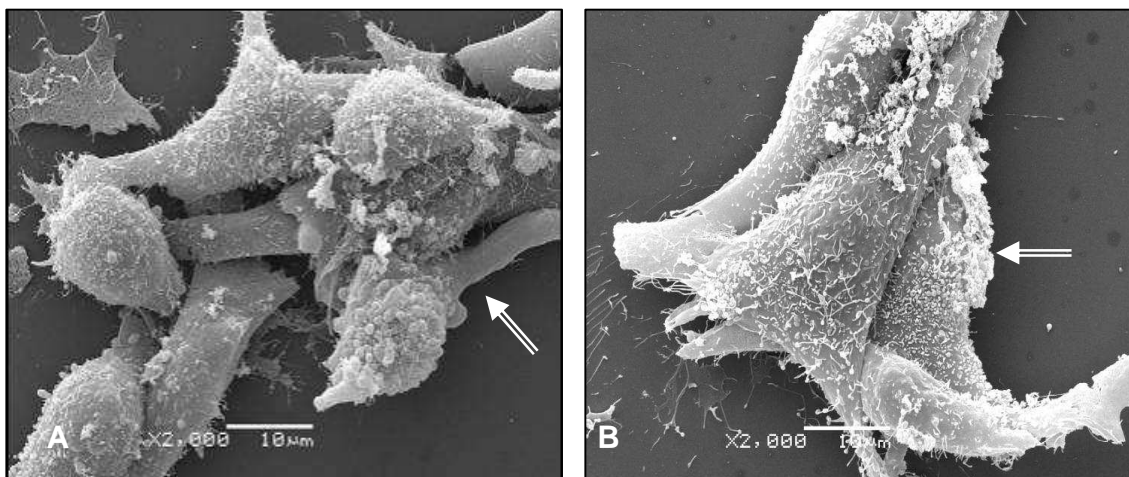
As células B16F10 quando interagiram por 48 h com linfócitos diretamente pré co-cultivados com macrófagos por 24 h mostraram redução na densidade de células de melanoma. No grupo tratado, além da alteração morfológica apresentada pelas células B16F10, foi observado grande aumento de fragmentos celulares nas células de melanoma apresentando aparente morte celular. Fig. I sem tratamento (controle) e Fig. J tratadas. Barras: 30 μ m.



6.2. Microscopia eletrônica de varredura de grupos selecionados da microscopia óptica

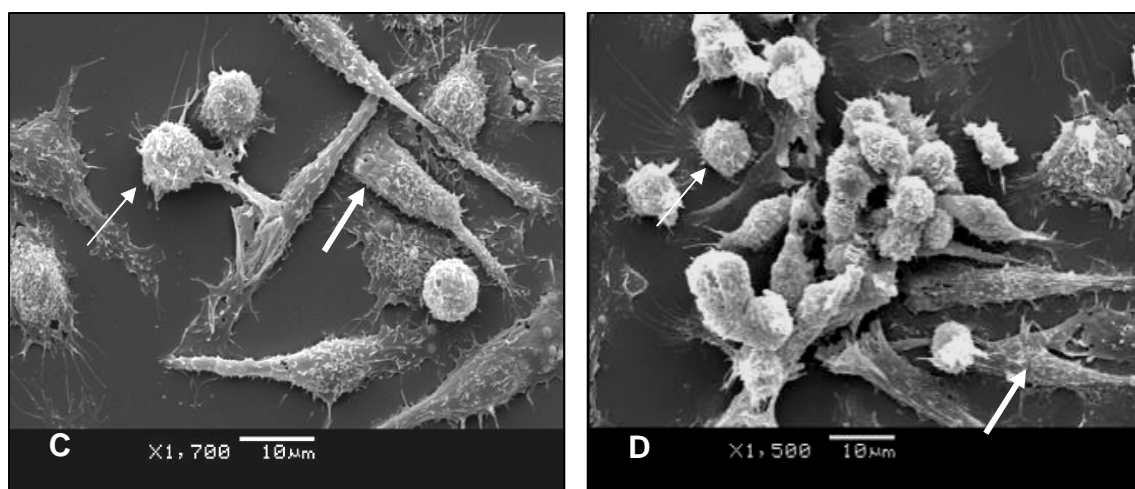
6.2.1. B16F10

Não foram observadas diferenças morfológicas entre o grupo de células B16F10 cultivadas por 48 horas na ausência de tratamento (Fig A) ou tratadas com Canova (Fig B). Setas abertas indicam células B16F10.



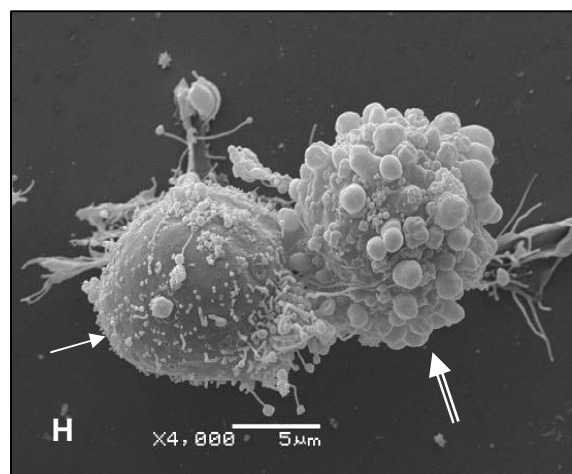
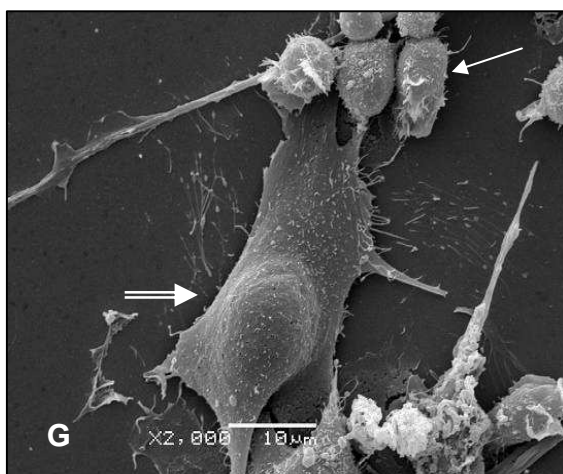
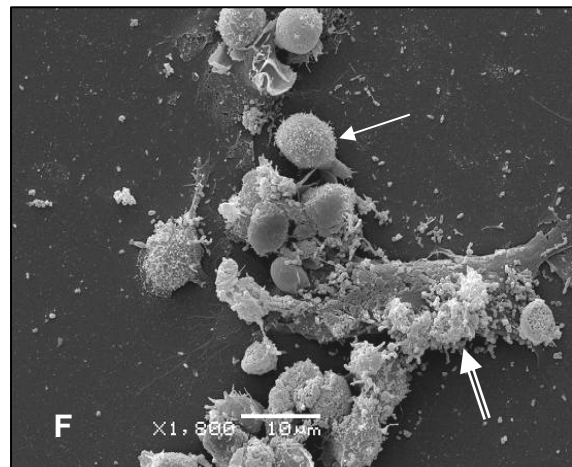
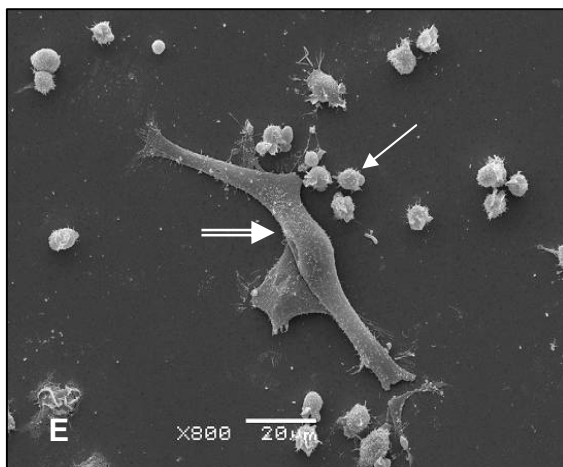
6.2.2. M ϕ -Ly

Linfócitos diretamente co-cultivados com macrófagos peritoneais por 48 horas obtiveram grande capacidade de interação com contato intercelular no grupo Canova com a formação de grumos celulares de linfócitos sobre os macrófagos aderentes. Setas grossas indicam macrófagos aderentes e setas finas indicam linfócitos. Fig. C sem tratamento e Fig. D tratadas.



6.2.3. B16F10/Ly-M ϕ

Linfócitos co-cultivados com macrófagos peritoneais por 24 horas e posteriormente transferidos para culturas de células B16F10 mostraram redução na densidade de células de melanoma fig. E e G (grupo controle). Linfócitos co-cultivados com macrófagos tratados com Canova e posteriormente transferidos para culturas de células B16F10 mostraram maior eficácia na destruição das células tumorais, resultando em maior redução na densidade de células de melanoma. Notar na fig. F (Tratada com Canova) que a célula tumoral já foi completamente lisada e na fig. H (Tratada com Canova) a célula B16F10 está em apoptose, apresentando muitos “blebs”. Setas abertas indicam células B16F10 e setas finas indicam linfócitos.



6.3. Microscopia de epifluorescência – Ensaio de apoptose TUNEL

Na análise do grupo de células B16F10 em contato com linfócitos previamente co-cultivados com macrófagos, linfócitos e células de melanoma em apoptose foram quantificados, também foi verificado a formação de aglomerados celulares de linfócitos sobre as células B16F10, para averiguação de interação intercelular, em uma razão de aproximadamente 100 células contadas por lamínula, em 9 lamínulas.

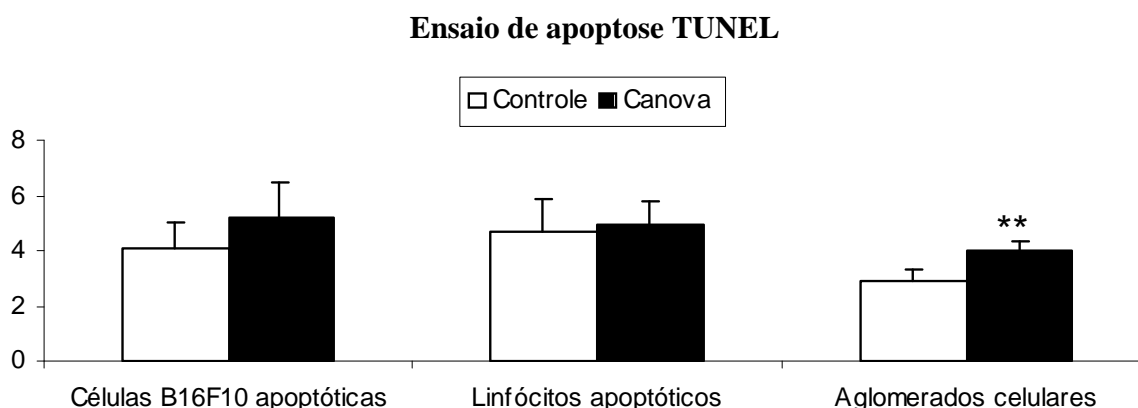


Gráfico: Ensaio de apoptose TUNEL. As células aderentes foram marcadas com iodeto de propídio (vermelho) para a localização nuclear e com a reação TdT-mediated FITC-dUTP nick-end labeling (verde) para a identificação dos núcleos apoptóticos. Foi quantificado o número de células B16F10 e linfócitos em apoptose, assim como o número de agrupamentos celulares entre linfócitos e células B16F10 (clusters). Foi averiguado maior número de células B16F10 em apoptose no grupo tratado com Canova, embora não tenha sido estatisticamente significativo. A apoptose nos linfócitos não apresentaram diferenças, enquanto que o número de agrupamentos celulares foi altamente significativo (**P < 0.01) no grupo tratado com Canova, demonstrando assim maior capacidade de interação dos linfócitos para com as células tumorais no tratamento com Canova. A contagem individual de cada parâmetro foi transformada em $\sqrt{x+0.5}$ para apresentar uma distribuição normal. Os dados foram submetidos a análise de variância fator único (ANOVA) para determinar a significância estatística.

6.4. Citometria de fluxo

6.4.1. Imunofenotipagem de células de linfonodo

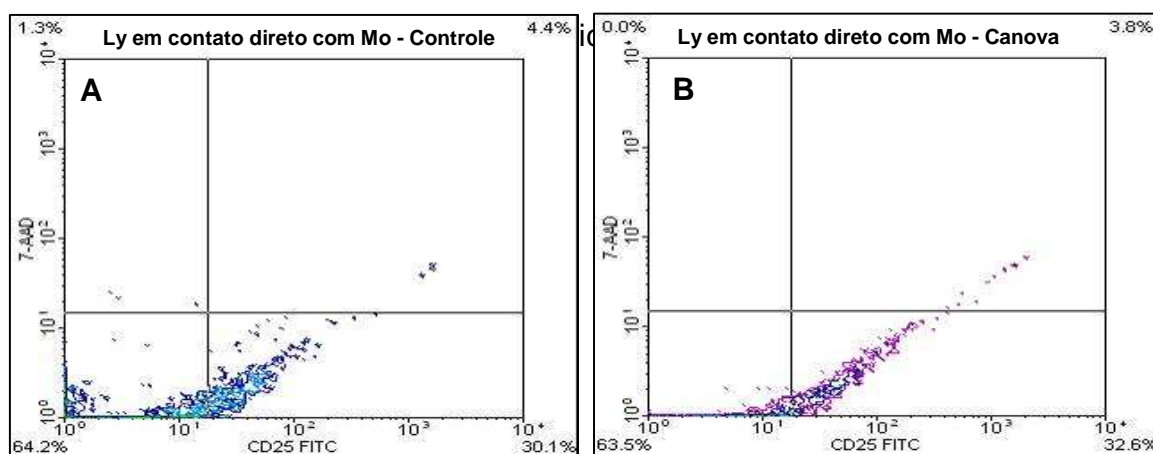
Para conhecer os subtipos da população de linfócitos presentes nos linfonodos foi realizada uma imunofenotipagem por citometria de fluxo. As médias de cada subpopulação de linfócitos são mostradas na Tabela 1. Como era esperado, o número de linfócitos CD3⁺CD4⁺ foi maior nos linfonodos de camundongo.

Marcadores	%
CD3CD4	44,85
CD3CD8	10,65
CD19	9,86
PanNK (CD49)	3,95
Células não marcadas	30,69

Tabela: Porcentagem das médias das populações dos subtipos linfocitários nos linfonodos mesentéricos de camundongos. 10.000 células foram adquiridas e analisadas por marcação e em triplicata.

6.4.2. Expressão de CD25 (ativação celular) e viabilidade em linfócitos co-cultivados com macrófagos

Nos ensaios de co-cultura, a ativação dos linfócitos foi mensurada pela expressão de CD25 nos grupos tratados com CA ou não, sendo cada experimento repetido três vezes e em triplicata. A tabulação dos resultados foi transformada por



Figuras A e B: Dot plot de aquisição/análise de dados da expressão do CD25 e viabilidade por citometria de fluxo no qual cada ponto representado no gráfico

representa uma célula, foram adquiridos 10.000 células por amostra. Os gráficos são divididos por eixo X (representando a expressão do CD25) e eixo Y (representando células marcadas com o marcador de inviabilidade 7-AAD). Os quadrantes que dividem os dot plots são referentes à positividade da marcação, os quadrantes acima de 10^1 são referentes às células positivas para as marcações. A análise de diferenças foi feita a partir da quantificação do quadrante inferior do lado direito (no qual representa os linfócitos ativados $CD25^{high}$ e viáveis $7-AAD^{low}$).

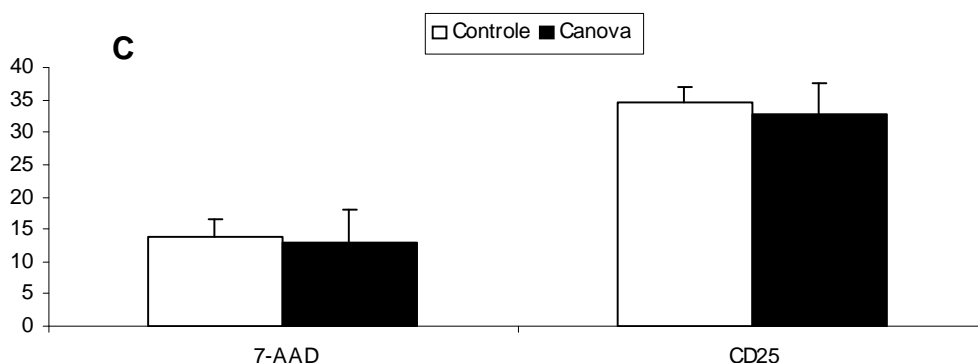


Figura C: M ϕ - Ly: não houve diferenças significativas quanto à expressão de CD25 e a viabilidade dos linfócitos (C) entre o grupo controle (A) tratado (B).

6.4.3. Expressão de CD25 (ativação celular) e viabilidade em linfócitos do grupo B16F10/Ly-M ϕ

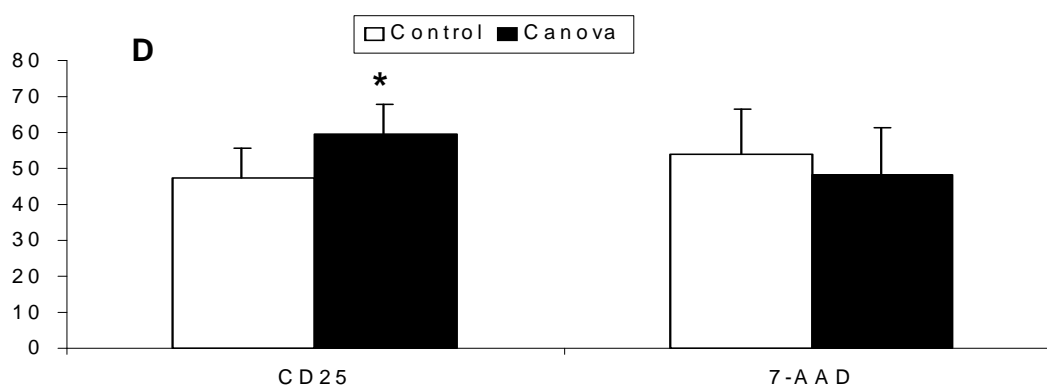
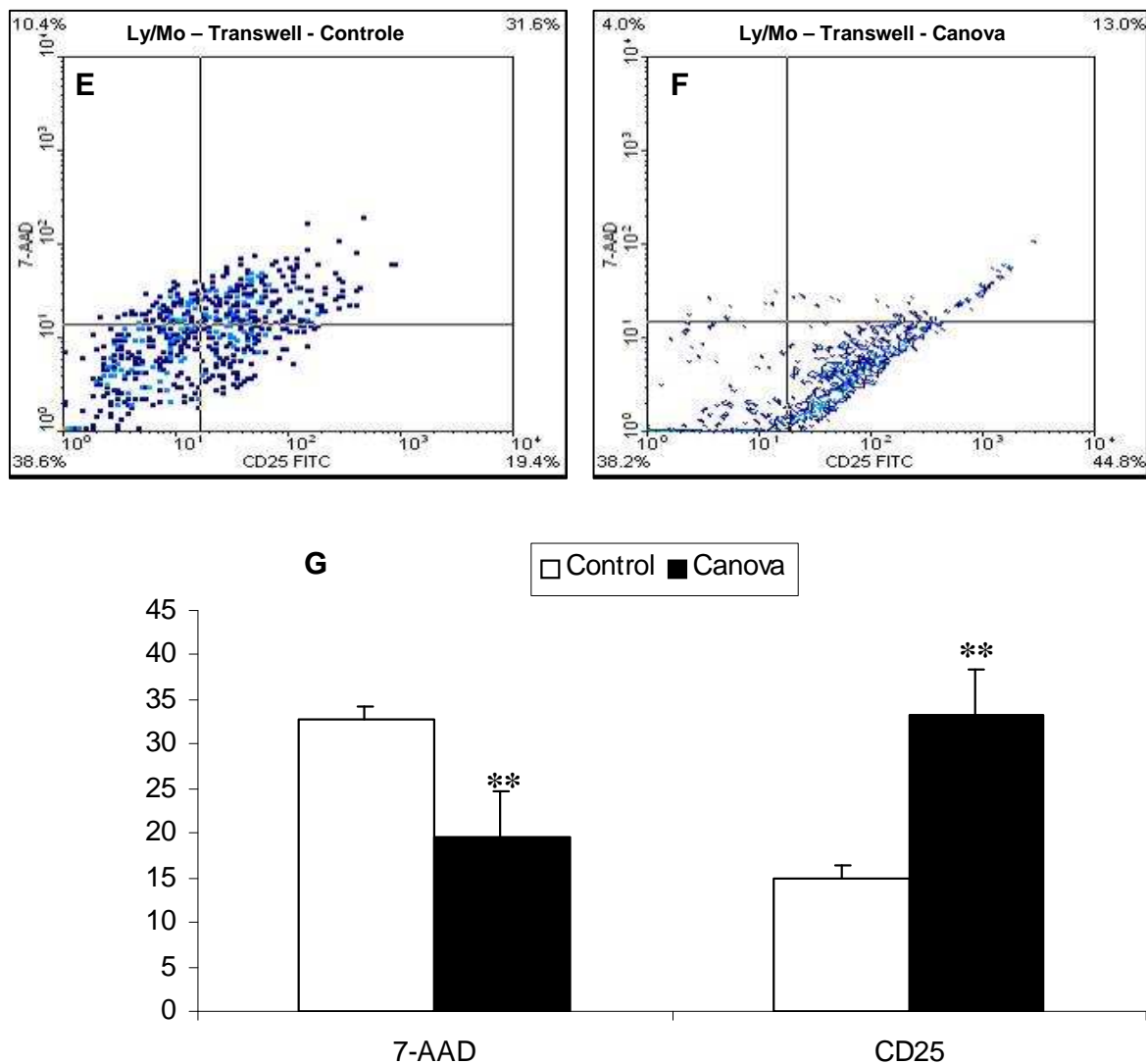


Figura D: Após o co-cultivo com M ϕ os Ly foram colocados sobre as B16F10 (B16F10/Ly-M ϕ). A expressão do CD25 foi maiores no grupo tratado, sendo a expressão do CD25 significativamente maior (*P < 0.05).

6.4.4. Expressão de CD25 (ativação celular) e viabilidade em linfócitos do grupo M ϕ /Ly*



Figuras E, F e G (M ϕ /Ly*): Foi realizado para averiguar a capacidade de ativação linfocitária sem o contato direto com macrófagos porém com o compartilhamento do mesmo meio de cultivo. A viabilidade celular dos linfócitos e a expressão de CD25 (ativação) nos linfócitos viáveis foi significativamente maior no grupo tratado (**P < 0.01).

7. DISCUSSÃO

Células tumorais usam múltiplos mecanismos para escapar do sistema imunitário. Drogas quimioterápicas têm sido desenvolvidas de modo a ativar a imunidade humoral e celular contra células malignas. Inclui-se em imunoterapias inovadoras o uso de imunotoxinas para a eliminação de linfócitos regulatórios da resposta antitumoral, uso de anticorpos monoclonais para potencializar a sinalização e a expansão ex vivo de células T anti-tumorais em combinação com a quimioterapia (DUDLEY et al., 2002). Há poucas e limitadas pesquisas sobre a efetividade da homeopatia no tratamento com câncer. CA é um medicamento homeopático sem toxicidade usado como imunomodulador em pacientes que estão com o sistema imune deprimido. Nossos resultados mostram que CA ativa linfócitos contra as células B16F10, principalmente quando os linfócitos são estimulados por macrófagos tratados. Houve alteração na morfologia, lise celular e conseqüente redução da densidade das células de melanoma. O efeito citotóxico dos linfócitos co-cultivados com macrófagos tratados com CA sobre o crescimento das células B16F10 foi analisado por microscopia de epifluorescência e eletrônica de varredura. Nossos resultados mostraram alta capacidade tumoricida dos linfócitos, porém não necessariamente por indução de apoptose. A formação de aglomerados de linfócitos sobre as células tumorais e sobre macrófagos, visualizado através da microscopia de epifluorescência e eletrônica de varredura foi significativamente maior no grupo tratado com CA. Isto sugere que o CA promove uma maior capacidade de interação dos linfócitos com células imunitárias e com células tumorais. Linfócitos podem destruir células anormais ou tumorais por outros mecanismos citotóxicos como, por exemplo, secreção de granzima B, perforinas e outros mediadores citotóxicos (GRIFFIOEN et al, 2006).

Macrófagos assim como células dendríticas possuem importante papel imunomodulatório na resposta imune primária iniciada por linfócitos. A intensidade de resposta dos linfócitos T contra patógenos pode ser diretamente determinada por macrófagos (LIU et al., 2001; GORDON, 2003). A progressão do câncer pode não ser simples resultado da ausência da resposta imune, porém da inabilidade de

células imunitárias efetoras controlarem ou destruir células tumorais. A interação entre células apresentadoras de antígenos (APC), como células dendríticas ou macrófagos e linfócitos T compreende trocas bidirecionais de sinais, da qual pode resultar na ativação e maturação de linfócitos T efetores (DEMEURE et al., 2001). Linfócitos T são capazes de gerar respostas tumoricidas espontâneas, mas o linfócito tumoricida é inativado durante a efetuação de mecanismos de escape das células tumorais (BOON et al., 2006). A ativação de células T é dependente de mecanismos de interação com APC. Esta ativação celular requer a interação com complexos MHC e TCR, moléculas co-estimulatórias ou e mediadores como citocinas. A produção de IL-2 e a expressão da cadeia- α do receptor de IL-2 (CD25) em linfócitos ativados conferem grande capacidade de condições efetora e proliferação celular (LIWSKI et al., 2006; LANZAVECCHIA; SALLUSTO, 2001). Nossos resultados confirmam isto, uma vez que o tratamento com CA aumentou expressão de CD25 (linfócitos ativados) e a viabilidade dos linfócitos não necessariamente por contato celular direto, mas por possíveis mediadores secretados ao meio de cultura pelos macrófagos ativados.

O medicamento CA ativa macrófagos. Essas células modulam a ativação linfocitária através de interações com a membrana e de secreção de citocinas como a IL-2, também essas células potencializam a ação anti-tumoral dos linfócitos. (FEHNIGER; COOPER; CALIGIURI, 2002; WATFORD et al., 2003). Nossos resultados mostram essa atividade através da eficácia dos linfócitos na destruição de células tumorais. As formações de aglomerados linfocitários sobre as células tumorais foram significativamente mais numerosas no grupo tratado com o CA, mostrando alta capacidade de interação dos linfócitos com as células tumorais. Muitos cânceres e todos os tipos de melanoma expressam proteínas de membranas B7-H1, que induzem a apoptose linfocitária. Linfócitos pré-ativados possuem melhores condições de escapar desse tipo de defesa de células cancerosas (TRAPANI, 2002). Linfócitos não são ativados diretamente pelo tratamento com CA, fato que sugere a importância da interação entre essas células imunitárias.

8. CONCLUSÃO

Os resultados mostram que CA ativa linfócitos através de interações com os macrófagos, com ou sem contato direto. Esses linfócitos ativados pelo CA destruíram as células de melanoma B16F10 de forma eficiente *in vitro*.

- Protocolos de cultivo celular com e entre linfócitos de linfonodos mesentéricos, macrófagos peritoneais e células de melanoma murino B16F10 foram estabelecidos com sucesso.
- Foi avaliado que o tratamento com Canova potencializa a reação anti-tumoral dos linfócitos quando estes interagiram com macrófagos, resultando em grande destruição das células tumorais pelos linfócitos quando observado por microscopia óptica e eletrônica de varredura.
- A ativação dos linfócitos (expressão do CD25) que interagiram com macrófagos e foram transferidos para cultivo com células tumorais foi maior no grupo tratado com Canova assim como a ativação dos linfócitos co-cultivados com macrófagos sem contato (sistema Transwell) foi maior no grupo tratado com Canova.

É importante continuar as pesquisas com esse medicamento, pois os resultados sugerem que seja um imunomodulador poderoso, um coadjuvante imunoterápico para melhorar a resposta imunitária contra células tumorais. As próximas etapas do estudo do tratamento celular com Canova são: averiguar a expressão de moléculas indutoras de morte celular, expressão de biomoléculas nas células tumorais e imunitárias e observar respostas imunitárias em diferentes modelos tumorais.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abud, A.P.R.; César, B.; Cavazzani, L.F.M.; De Oliveira, C.C.; Gabardo, J.; Buchi, D.F. Activation of bone marrow cells treated with Canova *in vitro*. **Cell Biology International**. vol. 30 (10), p. 808-816, 2006.
2. Boon, T.; Pierre, G.; Coulie-Benoit, J.; Eynde, V.; Bruggen, P. Human T Cell Responses Against Melanoma. **Annu. Rev Immunol**, vol. 24, p. 175–208, 2006.
3. Buchi, D.F.; De Souza, W. Internalization of surface components during ingestion of *Saccharomyces cerevisiae* by macrophage. **J. Submicrosc Cytol Pathol**, vol. 24 (1), p. 135–141, 1992.
4. Buchi, D.F.; De Souza, W. Internalization of surface components during Fc-receptor mediated phagocytosis by macrophages. **Cell Struct Funct**, vol. 18, p. 399–407, 1993.
5. Cesar, B.; Abud, A.P.R.; De Oliveira, C.C.; Cardoso, F.; Gremski, W.; Gabardo, J.; Buchi, D.F. Activation of mononuclear bone marrow cells treated *in vitro* with a complex homeopathic medication. **Micron**. 2007; *In press*.
6. Demeure, C.E.; Wolfersc, J.; Martin-Garcia, N.; Gaulard, P.; Triebel, F.T. Lymphocytes infiltrating various tumour types express the MHC class II ligand lymphocyte activation gene-3 (LAG-3): role of LAG-3/MHC class II interactions in cell–cell contacts. **European Journal of Cancer**, vol. 37, p. 1709–1718, 2001.
7. Oliveira, C.C.; Oliveira, S. M.; Godoy, L.M.F.; Gabardo, J.; Buchi, D.F. Canova, a Brazilian medical formulation, alters oxidative metabolism of mice macrophages. **Journal of Infection**, vol.; 52, p. 420-432, 2006.
8. Dudley, E.M.; Wunderlich, J.R.; Robbins, P.F.; Yang, J.C. et al. Cancer Regression and Autoimmunity in Patients After Clonal Repopulation with Antitumor Lymphocytes. **Science**, vol. 298, p. 850-854, 2002.

9. Fehniger, T.A.; Cooper, M.A.; Caligiuri, M.A. Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, vol. 13 (2), p. 169-183, 2002.
10. Gordon, S. Alternative activation on macrophages. **Nature Reviews – Immunology**, vol. 3, p. 23-35, 2003.
11. Griffioen, M.; Kessler, J.H.; Borghi, M.; Soest, R.A. et al. Detection and Functional Analysis of CD8+ TCells Specific for PRAME: a Target for T-Cell Therapy. **Clin Cancer Res**, vol. 12 (10), p. 3130-3136, 2006.
12. Lanzavecchia, A.; Sallusto, F. Antigen decoding by T lymphocytes: From synapses to fate determination. **Nature Immunology**, vol. 2, p. 487-492, 2001.
13. Liu, Y.J.; Kanzler, H.; Soumelis, V.; Gilliet, M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. **Nature Immunology**, vol. 2 (7), p. 585-589, 2001.
14. Liwski, R.S.; Chase, J.C.; Baldrige, W.H.; Sadek, I.; et al. Prolonged coestimulation is required for naïve T cell activation. **Immunology Letters**, vol. 106, p. 135-143, 2006.
15. Lopes, L.; Godoy, L.M.F.; De Oliveira, C.C.; Gabardo, J.; Schadeck, R.J.G.; Buchi, D.F. Phagocytosis, endosomal / lisosomal system and other cellular aspects of macrophage activation by Canova medication. **Micron**, vol. 37, p. 277-287, 2006.
16. Millazo, S.; Russell, N.; Ernst, E. Efficacy of homeopathic therapy in cancer treatment. **European Journal of Cancer**, vol. 42, p. 282-289, 2006.
17. Molife, R.; Hancock, B.W. Adjuvant therapy of malignant melanoma. **Current Reviews in Oncology/Hematology**, vol. 44, p. 81-102, 2002.
18. Nogueira, G.W.G.; Rimoli, M.A.; Turci, M.B.; Guilherme, S.D.; Mollo, S.A.; Barnabé, V.D. **Doutrina Médica Homeopática**, São Paulo, Grupo de Estudos Homeopáticos de São Paulo “Benoit Mure”, 1986.

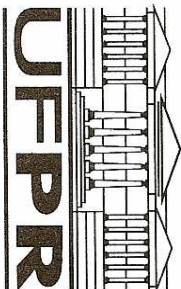
19. Pereira, W.K.V.; Lonardoni, M.V.C.; Grespan, R.; Caparroz-Assef, S.M.; Cuman, R.K.N.; Bersani-Amado, C.A. Immunomodulatory effect of Canova medication on experimental *Leishmania amazonensis* infection. **Journal of Infection**, vol. 51 (2), p. 157-164, 2005.
20. Piemonte, M.R.; Buchi, D.F. Analysis of IL-12, IFN-g and TNF-alpha production, $\alpha 5 \beta 1$ integrins and actin filaments distribution in peritoneal mouse macrophages treated with homeopathic medicament. **J Submicrosc Cytol Pathol**, vol. 33 (4), p. 255-263, 2002.
21. Rigel, D.S.; Carucci, J.A. Malignant Melanoma: Prevention, Early Detection, and Treatment in the 21st Century. **CA CANCER J CLIN**, vol. 50, p. 215-236, 2000.
22. Sato, D.Y.O.; Wal, R.; De Oliveira, C.C.; Cattaneo, R.I.I.; Malvezzi, M.; Gabardo, J.; Buchi, D.F. Histopathological and immunophenotyping studies on normal and sarcoma 180-bearing mice treated with a Brazilian homeopathic medication. **Homeopathy**, vol. 94 (1), p. 26-32, 2005.
23. Seligmann, I.C.; Lima, P.D.; Cardoso, P.C.; Khayat, A.S.; Bahia, M.O.; Buchi, D.F.; Cabral, I.R.; Burbano, R.R. The anticancer homeopathic composite "Canova Method" is not genotoxic for human lymphocytes *in vitro*. **Genet Mol Res**, vol. 2 (2), p. 223-228, 2003.
24. Takahachi, G.; Maluf, M.L.F.; Dalalio, M.M.O.; Bersani-Amado, C.A. Cuman RKN. *In vivo* and *in vitro* effects of the Canova medicine on experimental infection with *Paracoccidioides brasiliensis* in mice. **Indian Journal of Pharmacology**, vol. 38 (5), p. 350-354, 2007.
25. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. **Lancet**, vol. 365, p. 687–701, 2005.
26. Trapani, J.A. Tumor-mediated apoptosis of cancer-specific T lymphocytes – Reversing the "kiss of death"? **Cancer Cell**, vol. 2 (3), p. 169-171, 2002.

27. Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, O'Shea JJ. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, vol. 14 (5), p. 361-368, 2003.

10. ANEXOS

10.1. Certificado de aprovação do projeto no Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEa/UFPR).

- 10.2.** Aprovação do projeto pela Fundação Araucária para o Programa de Apoio à Pesquisa Básica e Aplicada – Universal / 2007.
- 10.3.** Apresentação de trabalho no Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise (CSBMM – 2007) sob o título: INTERACTION CELL STUDY AFTER CANOVA MEDICATION TREATMENT: MACROPHAGES, LYMPHOCYTES AND MELANOMA CELLS. Autores: Fernando de S.F. Guimarães et al.
- 10.4.** Apresentação de trabalho no Congresso Internacional de Microscopia Eletrônica, CIASEM realizado em Cuzco/Peru – 2007 sob o título: LYMPHOCYTE'S RESPONSE AGAINST MELANOMA CELLS AFTER STIMULATION WITH MACROPHAGES PREVIOUS TREATED WITH A HOMEOPATHIC MEDICAMENT. Autores: Fernando de S.F. Guimarães, et al.
- 10.5.** Apresentação de trabalho na XV Jornada de Jóvenes Investigadores de La AUGM, realizada em Asunción/Paraguai - 2007 sob o título: RESPOSTA ANTI-MELANOMA APÓS INTERAÇÃO ENTRE CÉLULAS IMUNITÁRIAS TRATADAS COM O MEDICAMENTO CANOVA. Autores: Fernando de S.F. Guimarães, et al.
- 10.6.** Submissão de artigo completo em revista internacional indexada, sob o título: LYMPHOCYTE'S STIMULATION *IN VITRO* AGAINST MELANOMA CELLS AFTER CO-CULTURE WITH MACROPHAGES PREVIOUS TREATED WITH A HOMEOPATHIC MEDICAMENT. Autores: Fernando de S.F. Guimarães, et al.
- 10.7.** Relatório anual do EVINCI – 2007 indicado pela Coordenadoria de Iniciação Científica para representar a UFPR no 5º Prêmio Destaque do Ano na Iniciação Científica / 2007, na categoria Ciências da Vida.
- 10.8.** Protocolo de processamento para micr. óptica com coloração de Giemsa.
- 10.9.** Protocolo de processamento para MEV.
- 10.10.** Protocolo de imunomarcção para citometria de fluxo.



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA)



CERTIFICADO

N.º 180

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA N.º 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEAA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO N.º 01/03-BL, de 09 de maio de 2003, e considerando o contido no Regimento Interno do CEEAA, **CERTIFICA** que os procedimentos que utilizam animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

APROVADO.

PROCESSO: 23075.026379-2006-11

RO 07/2006 em 04/07/2006

TÍTULO: Pesquisa em células inflamatórias utilizando o medicamento homeopático Canova: um estudo da interação entre macrófagos e linfócitos em co-cultura

AUTORES: Dorly de Freitas Buchi, Fernando de Souza Fonseca Guimarães, Carolina Camargo de Oliveira, Simone M. Oliveira, Ana Paula Abud, Beatriz César, Juarez Gabardo

DEPARTAMENTO: Biologia Celular
Curitiba, 07 de julho de 2006.

Profª. Ana Maria Filadelfi
Coordenadora do CEEAA

10.2.



Apelo ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná

Ato da Diretoria Executiva 10/2007

Chamada de Projetos 01/2006
Programa de Apoio à Pesquisa Básica e Aplicada - Universal

A Diretoria Executiva da Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná torna público o resultado da aprovação de projetos da Chamada de Projetos 01/2006 - Programa de Apoio à Pesquisa Básica e Aplicada - Universal, totalizando R\$ 744.019,60 (setecentos e quarenta e quatro mil e noventa e seis reais e sessenta centavos).

Instit.	Prot.	Título do Projeto	Coordenador
Ciências Agrárias - Modalidade A			
Unicentro	6587	Implantação de um Sistema de Monitoramento e Crescimento da Floresta Ombrófila Mista no Sistema Fazendal	Luciano Farinha Wabizwick
Ciências Agrárias - Modalidade B			
UEL	8063	Qualidade e segurança microbiológica de água e alimentos de origem animal expostos ao consumo em restaurantes de Ilha do Mel - PR	Venerli Betoldi
UEM	8532	Valor alimentício de silagem de grãos de milho (<i>Zea mays</i> L.) com adição de soja crua, grassol ou uréia e desempenho de ovinos em confinamento	Cláudia Cabreira Jobim
Arquitetura e Urbanismo - Modalidade B			
UEM	8551	Imagens da cidade: registros fotográficos de Maringá antiga	Renato Leão Rego
Ciências Biológicas - Modalidade A			
PUC	7705	Associação entre polimorfismos no gene CDKN1B e aumento no risco de desenvolvimento de Câncer de Próstata	Fábio Rueda Faurzi
UEM	9383	Ácido chiquímico como marcador na discriminação entre soja convencional e transgênica	Maria de Lourdes Lucio Ferraz
Cesumar	9799	Sítios intrínsecos de DNA bent na origem de replicação cromossomal de <i>Xylella fastidiosa</i>	Adriana Fiorini
Ciências Biológicas - Modalidade B			
UFPR	6387	Caracterização de arranjos auto-organizados da proteína GlnB DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> sobre substratos sólidos	Elaine Machado Benelli
UFPR	8786	Produção de ferramentas moleculares aplicadas na análise biotecnológica de toxinas de animais peçonhentos	Silvio Sanchez Veiga
UFPR	9238	Avaliação de toxinas iônicas como ferramentas moleculares aplicadas à biotecnologia	Waldemiro Gremali
UEL	9791	Investigação sobre a organização e evolução do genoma de espécies do gênero <i>Hypochaeris</i> , pela identificação e mapeamento de famílias de retrotransposons	Claudete de Fátima Ruas
Ciências Biológicas - Modalidade C			
UFPR	3481	Pesquisa em células inflamatórias utilizando o medicamento homeopático Canova: Estudo da interação entre macrófagos e linfócitos em co-cultura	Dorly de Freitas Buchi
UFPR	9712	Validação da atividade protetora gástrica de plantas medicinais exóticas adaptadas e da biodiversidade brasileira (<i>Salvia officinalis</i> (sálvia), <i>Tabebuia avellanae</i> (pá roxo) e <i>Arctium lappa</i> L. (bardana)) p/ o desenvolvimento de fitoterápicos.	Maria Consuelo Andrade Marques

Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná
 Av. Com. Franco, 1341 - 31. Botânico - 80215-090 - Curitiba-PR - www.FundacaoAraucaria.org.br



XXI Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise
21st Congress of the Brazilian Society for Microscopy and Microanalysis
Multidisciplinaridade em Microscopia

Certificado

Certificamos que o trabalho 116 "INTERACTION CELL STUDY AFTER CANOVA MEDICATION
TREATMENT: MACROPHAGES, LYMPHOCYTES AND MELANOMA CELLS" de autoria de Guimarães, F. S.
F.; De Oliveira, S. M.; Abud, A. P. R.; Maruyama, E. F. Y.; Vairo, K. P.; Oliveira, C. C.; Buchi, D. F. foi
apresentado como pôster durante o XXI Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise
realizado no Hotel Atlântico Búzios, em Armação dos Búzios, Rio de Janeiro de 26 a 29 de agosto de 2007.

Márcia Attias
Presidente SBMM 2006-2008

Apoio:



Realização:



9th Inter-American Congress of Electron Microscopy

Cusco 23-28 September 2007

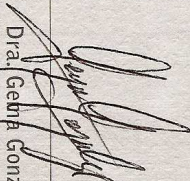


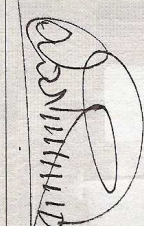
CERTIFICATE

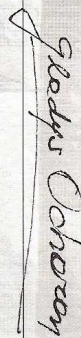
This is to certify that FERNANDO DE SOUZA FONSECA GUIMARAES

participated as POSTER PRESENTATION

in the 9th Inter-American Congress of Electron Microscopy - CIASEM 2007, held from the 23rd to the 28th of September, 2007, in the city of Cusco, Peru.


Dra. Gebru González
Chairwoman Scientific Committee
CIASEM 2007


Dr. Alan Castellano
President of the Inter-American Committee
of Societies of Electron Microscopy


Dra. Gladys Ocharan
President of the Organizing Committee
CIASEM 2007

PART 13

10.5.

.....webmail.ufpr.br..... - Mozilla Firefox

Imprimir... Configurar página... Página: 1 de 2 Escala: 100% Retrato Paisagem Fechar

.....webmail.ufpr.br..... https://webmail.ufpr.br/src/webmail.php

51.7% of 100.0M
51.7%

Pastas
Última Atualização:
Dom, 9:44 am
(Checar Email)

- **Entrada** (3)
- Drafts
- Sent
- Trash (Esvaziar)
- cap livros
- congressos
- publicações

Utilização das Pastas

Pasta Atual: **Entrada** [Desconectar](#)

[Escrever](#) [Endereços](#) [Pastas](#) [Opções](#) [Procurar](#) [Ajuda](#) [UFPR](#)

[Calendário](#) [Buscar](#)

Lista de Mensagens | [Apagar](#) [Anterior](#) | [Próxima](#) [Encaminhar](#) | [Encaminhar como anexo](#) | [Respon](#)

Assunto: XV Jornadas de Jovens Investigadores

De: "augm UFPR" <augm@ufpr.br>

Data: Seg, Agosto 13, 2007 10:42 am

Para: labbiocel@ufpr.br

Prioridade: Normal

Opções: [Ver cabeçalho completo](#) | [Ver Versão para Impressão](#) | [Baixar como um arquivo](#) | [Adicionar ao Livro de Endereços](#) | [Bounce](#)

Prezado Fernando,

Informamos que o trabalho intitulado "Resposta anti-melanoma : interação entre células imunitárias tratadas com o medicamento foi avaliado e foi aceito para representar a UFPR nas XV Jornadas Jovens Investigadores da AUGM.

Informamos também que o trabalho completo pode ser apresentado 30 de agosto para ser publicado nos anais do evento. O texto completo será enviado para a Secretaria da AUGM/UFPR. As normas para a apresentação do trabalho completo estão disponíveis em www.augm.ufpr/jornadas_augm.html.

Haverá um auxílio para a participação do autor principal de trabalhos selecionados, com prioridade para os trabalhos que foram encaminhados na forma completa. A forma deste auxílio a ser comunicada posteriormente.

Secretaria da AUGM/UFPR

10.6.

Editorial Manager(tm) for Melanoma Research
Manuscript Draft

Manuscript Number: MR-D-07-00077

Title: LYMPHOCYTES IN VITRO STIMULATION AGAINST MELANOMA CELLS AFTER CO-CULTURE
WITH MACROPHAGES PREVIOUS TREATED WITH A HOMEOPATHIC MEDICAMENT

Article Type: Original Study

Section/Category: Basic Science

Keywords: antitumor activity; macrophages; lymphocytes; melanoma cells; cell interaction; Canova
medication

Corresponding Author: Dr dorly de freitas buchi, PhD

Corresponding Author's Institution: universidade federal do paraná

First Author: Fernando Guimarães, student

Order of Authors: Fernando Guimarães, student; Ana Abud, MSc; Simone M Oliveira, MSc; Carolina C
DeOliveira, PhD; Beatriz Cesar, MSc; Lucelia Donatti, PhD; Ruth Schadeck, PhD; Juarez Gabardo, MSc;
Dorly F Buchi, PhD

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: Melanoma is the most aggressive form of skin cancer and is the fastest growing cancer with an increasing incidence rate in world population. Till now chemotherapeutic approaches to treating melanoma have been uniformly disappointing. Canova (CA) is a Brazilian homeopathic medication with immunomodulatory properties, recommended for patients where the immune system is depressed. Previous studies demonstrated that Canova induces up-regulation in numbers of leukocytes and improvement on the mice response against Sarcoma-180. We now report the effects of in vitro stimulation of mice lymph nodes lymphocytes when co-cultured or not with macrophages submitted to Canova treatment, interacting with B16F10 melanoma cells. Morphological parameters, viability, apoptosis and a lymphocyte activation marker (CD25) were analyzed using optical, epifluorescence, scanning electron microscopy, and flow cytometry.

10.7.

Yahoo! Mail - ferbiocel@yahoo.com.br - Mozilla Firefox

Imprimir... Configurar página... Página: 1 de 1 Escala: 70% Retrato Paisagem Fechar

Yahoo! Mail ferbiocel@yahoo.com.br

Buscar: YAHOO! code?

YAHOO! MAIL

Olá, ferbiocel

Verificar e-mail Escrever

Seu celular com os melhores contatos.

Atalhas para buscas

Minhas fotos

Meus anexos

Minhas pastas

Entrada (11)

Rasounho

Enviadas

Em massa (1)

Lixeira

Minhas pastas

Aymen

Cit

Citometro

Laboratório

Pablo.de

Toefl

Atalhas para buscas

Minhas fotos

Meus anexos

Inclusão cv por 7 dias grátis!

Ministério Compras e Gestão

Tudo do Yahoo!

Salve suas ideias aqui!

Verificar e-mail Escrever

Apagar Responder Encaminhar Spam Transferir

Mensagem não sinalizada. [Sinalizar • Marcar como não lida]

De: "Iniciação Científica" <ic@ufpr.br> [Ver detalhes do contato](#)

Para: "Tiago" <tiago_bonato@pop.com.br> , marcosbasso@ufpr.br, ferbiocel@yahoo.com.br

Assunto: 5º Prêmio destaque do ano na Iniciação Científica

Data: Wed, 5 Sep 2007 14:55:48 -0300

Atenção alunos dos quais os relatórios de Iniciação Científica foram selecionados pelo Comitê Assessor de Pesquisa para concorrerem ao 5º Prêmio Destaque do Ano na Iniciação Científica:

Tiago Bonato
Marcos Aurélio Basso
Fernando de Souza Fonseca Guimarães

Favor remeterem para este e-mail a seguinte documentação em arquivo:

Preenchimento da ficha de inscrição (scanizada)
Relatório final, e (arquivo Word)
Resumo (arquivo Word)

É urgente pois as instituições deverão transmitir os referidos arquivos para o site do Prêmio até dia 10 de setembro de 2007, segunda-feira próxima.

Atenciosamente
Marianne
Coordenadora de Iniciação Científica

Apagar Responder Encaminhar Spam Transferir

Verificar e-mail Escrever

Copyright © 2007 Yahoo! Inc. Todos os direitos reservados. [Direitos Autorais](#) [Política de IP](#) [Termos do Serviço](#) [Ajuda](#)

AVISO: Nós coletamos informações pessoais nesta página. Para saber mais sobre como nós tratamos essas informações, consulte nossa [Política de Privacidade](#)

10.8. Protocolo de microscopia óptica com coloração de Giemsa

- Cultivo celular com lamínulas circulares em placas 24/well;
- Retiragem do meio de cultura;
- Lavagem com PBS pH 7.4 à 37°C, 1ml/well;
- Fixação com bouin, 400µl/well por 5 min;
- Lavagem com água destilada, 3 vezes;
- Coloração com giemsa 800µl/well por 1 h (o período de tempo varia conforme a concentração do corante, é necessário consultar o fabricante para determinar o tempo correto).
- Desidratação progressiva, as lamínulas devem ser retiradas da solução de giemsa com pinça de ponta fina e passar pela seguinte bateria de beckers (10 segundos em cada) com soluções previamente preparadas:
 - 1 – Água destilada;
 - 2 – Acetona PA;
 - 3 – Acetona PA;
 - 4 – Mistura I (1 parte de xilol + 2 partes de acetona);
 - 5 – Mistura II (1 parte de xilol + 1 parte de acetona);
 - 6 – Mistura III (2 partes de xilol + 1 parte de acetona);
 - 7 – Xilol PA;
 - 8 – Xilol PA.
- Montagem das lamínulas nas lâminas com 15µl de entelan previamente colocado.
- Secagem das lâminas por 48 horas em temperatura ambiente até a análise.

10.9. Protocolo de processamento para MEV

- Cultivo celular com lamínulas circulares em placas 24/well;
- Retiragem do meio de cultura;
- Lavagem com PBS pH 7.4 à 37°C, 1ml/well;
- Fixação: Glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 por 2 horas em temperatura ambiente.
- Lavagem em Tampão Cacodilato de Sódio, pH 7.4 0,1M, 3 vezes 10 minutos cada.
- Pós-fixação: Tetróxido de Ósmio 1% em Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M, por 15 minutos, no escuro e à temperatura ambiente
- Lavagem em Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M, 3 vezes.
- Desidratação: álcool 50%, 70%, 90% e 100%, de 10 a 20 minutos cada.
- Ponto Crítico: CO₂.
- Metalização: ouro.
- Observação : Microscópio Eletrônico de Varredura.

10.10. Procolo de imunomarcção para citometria de fluxo

1. Quantificar as células a serem marcadas por câmara de Neubauer ou contador automático;
2. Em um tubo apropriado para C.F. (Citômetro de Fluxo), colocar uma quantidade de células aproximada de 10^6 cels/tubo em 50µl do tampão recomendado pelo fabricante do anticorpo e adicionar o anticorpo monoclonal na quantidade recomendada pelo fabricante, homogeneizar e incubar por 30' no escuro, a 4°C;
3. Lavagem com PBS três vezes, adicionando o tampão e centrifugando a 1200 rpm por 8 min antes de descartar o sobrenadante;
4. Acrescentar 500µl de PBS e homogeneizar,

Observação, caso seja utilizado o corante vital 7-AAD na mesma amostra que foi marcada com anticorpos, adicionar 10µl da solução comercial de 7-AAD no homogeneizado final após as marcações com os anticorpos. O período de incubação do 7-AAD é de 10 minutos no escuro a temperatura ambiente.

Adquirir em C.F.